



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND

DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 198 18 541 A 1

attech to HDO
09960738
⑯ Int. Cl. 6:

C 12 P 1/00

C 12 P 13/04
C 12 P 13/22
C 12 N 15/52
C 12 N 1/21
// (C12P 1/04,C12R
1:19)(C12P 13/04,
C12R 1:19)(C12P
13/22,C12R 1:19)
(C12N 1/21,C12R
1:19)

⑰ Anmelder:
Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich,
DE; Holland Sweetener Co. V.o.F., Maastricht, NL
⑰ Vertreter:
Dres. Fitzner & Münch, 40878 Ratingen

⑰ Erfinder:
Sprenger, Georg, Dr., 52428 Jülich, DE; Krämer,
Marco, 52428 Jülich, DE; Sahm, Hermann, Prof.Dr.,
52428 Jülich, DE; Karutz, Martin, Dr., Sittard, NL
⑮ Entgegenhaltungen:
US 50 32 514
J. Biotechnol. 43, S. 41-44 (1995);
Chemical Abstracts Vol. 115, Nr. 86331;
Chemical Abstracts Vol. 125, Nr. 77855;
Chemical Abstracts Vol. 119, Nr. 89942;
Chemical Abstracts Vol. 114, Nr. 18952;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Mikrobielle Herstellung von Substanzen aus dem aromatischen Stoffwechsel / III

⑯ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Substanzen, insbesondere von aromatischen Aminosäuren. Weiterhin betrifft die Erfindung Genstrukturen sowie transformierte Zellen. Erfindungsgemäß wird durch Einbringen oder Erhöhung der Aktivität einer Lukosedehydrogenase eine Erhöhung der Produktion von Substanzen, insbesondere aromatischen Aminosäuren beobachtet. Eine Erhöhung der Aktivität eines glukose-oxidierenden Enzyms führt zur intrazellulären Bildung von Glukonolakton und Lukonsäure aus glukosehaltigen Substraten. In einer bevorzugten Ausführungsform stammt die Glykosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium*. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann ein weiteres Spektrum von Substanzen bereitgestellt werden.

DE 198 18 541 A 1

DE 198 18 541 A 1

Beschreibung

- Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Substanzen, insbesondere von aromatischen Aminosäuren, nach Anspruch 1 bis 20 und 30, Genstrukturen nach Anspruch 21 bis 23, sowie transformierte Zellen nach 5 Anspruch 24 bis 29.
- Mikrobiell hergestellte Substanzen, wie Feinchemikalien, insbesondere aromatische Aminosäuren sind von großem wirtschaftlichen Interesse, wobei der Bedarf an z. B. Aminosäuren weiterhin zunimmt.
- So wird beispielsweise L-Phenylalanin zur Herstellung von Medikamenten und insbesondere auch bei der Herstellung des Süßstoffes Aspartam (α -L-Aspartyl-L-phenylalaninmethylester) verwendet. L-Tryptophan wird als Medikament und 10 Zusatz zu Futtermitteln benötigt; für L-Tyrosin besteht ebenfalls Bedarf als Medikament, sowie als Rohstoff in der pharmazeutischen Industrie.
- Neben der Isolierung aus natürlichen Materialien ist die biotechnologische Herstellung eine sehr wichtige Methode, um Aminosäuren in der gewünschten optisch aktiven Form unter wirtschaftlich vertretbaren Bedingungen zu erhalten. Die biotechnologische Herstellung erfolgt entweder enzymatisch oder mit Hilfe von Mikroorganismen.
- 15 Die letztere, mikrobielle Herstellung hat den Vorteil, daß einfache und preisgünstige Rohstoffe eingesetzt werden können. Da die Biosynthese der Aminosäuren in der Zelle aber in vielfacher Weise kontrolliert wird, sind bereits vielfältige Versuche zur Steigerung der Produktbildung unternommen worden. So wurden z. B. Aminosäure-Analoga eingesetzt, um die Regulation der Biosynthese auszuschalten. Beispielsweise wurden durch Selektion auf Resistenz gegen Phenylalanin-Analoga Mutanten von Escherichia coli erhalten, die eine erhöhte Produktion von L-Phenylalanin ermöglichten.
- 20 (GB-2,053,906). Eine ähnliche Strategie führte auch zu überproduzierenden Stämmen von Corynebacterium (JP-19037/1976 und JP-39517/1978) und Bacillus (EP-0,138,526).
- Des Weiteren sind durch rekombinante DNS-Techniken konstruierte Mikroorganismen bekannt, bei denen ebenfalls die Regulation der Biosynthese aufgehoben ist, indem die Gene, die für nicht mehr feedback-inhibierten Schlüsselenzyme kodieren, kloniert und exprimiert werden. Als ein Vorbild beschreibt EP-0,077,196 ein Verfahren zur Produktion 25 von aromatischen Aminosäuren, bei dem eine nicht mehr feedback-inhibierte 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphatsynthase (DAHP-Synthase) in E. coli überexprimiert wird. In EP-0,145,156 ist ein E. coli-Stamm beschrieben, in dem zur Produktion von L-Phenylalanin zusätzlich Chorismatmutasc-/Prcphcnatdhydratasc überexprimiert ist.
- Den genannten Strategien ist gemeinsam, daß sich der Eingriff zur Verbesserung der Produktion auf den für die aromatischen Aminosäuren spezifischen Biosyntheseweg beschränkt. Für eine weitere Erhöhung der Produktion muß jedoch eine verbesserte Bereitstellung der zur Produktion aromatischer Aminosäuren benötigten Primärmetabolite Phosphaenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-Phosphat (Ery4P) angestrebt werden.
- 30 PEP ist ein aktiver Vorläufer des Glycolyseproduktes Pyruvat (Brenztraubensäure); Ery4P ist ein Intermediat des Pentosephosphatweges.
- Diese vielfältigen Versuche zur Produktivitätssteigerung sind insgesamt darauf gerichtet, die Limitation der cytosolischen Synthese der Aminosäuren zu überwinden. Bei der Produktion aromatischer Aminosäuren werden die Primärmetabolite Phosphaenolpyruvat (PEP) und Ery4P für die Kondensation zu 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) benötigt.
- In der Literatur sind mehrere Strategien für die Steigerung der Verfügbarkeit von Ery4P beschrieben, wie beispielsweise durch Überexpression der Transketolase eine erhöhte Bereitstellung von Ery4P und in Folge eine verbesserte Produktbildung von L-Tryptophan, L-Tyrosin oder L-Phenylalanin ermöglicht (EP Patentanmeldung Nr. 0 600 463; Frost & Draths, Ann. Rev. Microbiol. 49 (1995) 557-579). Kürzlich wurde gezeigt (Flores et al. Nature Biotechnology 14 (1996) 620-623), daß eine spontane Glukose-positive Revertante einer PTS-negativen Mutante von Escherichia coli Glukose über das GalP-System in die Zellen einschleuste und zum Wachstum auf Glukose befähigt war. Durch zusätzliche Expression des Transketolase-Gens tktA wurde eine vermehrte Bildung des Intermediates DAHP beobachtet (Flores et al. Nature Biotechnology 14 (1996) 620-623).
- 45 Von den Anmeldern wurde in 2 noch nicht veröffentlichten deutschen Patentanmeldungen mit den Aktenzeichen DE 1 96 44 566.3 und DE 1 96 44 567.1 gezeigt, daß durch die Erhöhung der Enzymaktivitäten von Transaldolase oder Transaldolase und Transketolase in Escherichia coli bzw. durch Erhöhung der Aktivität einer Glukokinase in Escherichia coli oder einer Glukokinase und eines PEP-unabhängigen Transportsystems für Zucker in Escherichia coli oder durch 50 Kombinationen der angegebenen Enzyme und des Transportsystems z. B. Phenylalanin in erhöhtem Maße bereitgestellt werden konnte.
- Es ist die Aufgabe der Erfindung, ein weiteres Verfahren zur Verfügung zu stellen, durch das eine verbesserte mikrobielle Synthese von Substanzen, insbesondere aromatischen Aminosäuren, erreicht wird.
- 55 Es soll auch ein Mikroorganismus geschaffen werden, bei dem die Bildung von Substanzen erhöht ist.
- Überraschenderweise wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß Glukose oder glukosehaltige Substrate in einem Substanzen produzierenden Mikroorganismus durch die Erhöhung der Aktivität eines Glukose oxidierenden Enzyms über einen alternativen Stoffwechselweg umgesetzt werden. Dieser alternative Stoffwechselweg umfaßt die Oxidation der freien Glukose zu Glukonolaktion/Glukonat, sowie die Phosphorylierung des Glukonats zu 6-Phosphoglukonat.
- 60 Dieses Ergebnis ist besonders überraschend, als daß es keineswegs selbstverständlich ist, daß die alleinige Erhöhung der Aktivität eines Glukose oxidierenden Enzyms eine wesentliche Rolle bei der Produktion von Substanzen hat.
- Unter Substanzen im Sinne der Erfindung sind beispielsweise Feinchemikalien wie aromatische Aminosäuren, Indigo, Indolessigsäure, Adipinsäure, Melanin, Chinone, Benzoësäure, sowie deren potentielle Derivate und Folgeprodukte zu verstehen. Alle diese Substanzen werden im Rahmen dieser Erfindung auch als Substanzen aus dem aromatischen Stoffwechsel angesehen. Damit sollen alle Verbindungen umfaßt sein, deren biochemische Synthese durch die erhöhte Bereitstellung von Ery4P oder Ery4P und PEP begünstigt wird.
- 65 Es sei dabei bemerkt, daß für die Herstellung von Indigo, Adipinsäure und anderen nicht natürlichen Folgeprodukten neben den erfindungsgemäßen Eingriffen weitere genetische Veränderungen an den die Substanzen produzierenden Mikroorganismen notwendig sind. (Frost & Draths (Ann. Rev. Microbiol. 49 (1995) 557-579)).

DE 198 18 541 A 1

Bevorzugt eignet sich das neue Verfahren um Substanzen zu produzieren, bei deren Herstellung Ery4P beteiligt ist. Substanzen produzierende Mikroorganismen können Glukose oder glukosehaltige Substrate, d. h. glukosehaltige Di- und Oligosaccharide, auf verschiedenen Wegen verstoffwechseln: So ist bekannt, daß Glukose durch ATP-abhängige Kinasen (Hexokinase, Glukokinasen) phosphoryliert und damit in die Glykolyse eingeschleust wird. Außerdem verfügen viele Bakterien über ein PEP-abhängiges System zur Aufnahme und Phosphorylierung von Glukose.

Durch verschiedene lösliche oder membrangebundene Enzyme kann Glukose auch oxidiert werden (über Glukonolaktone zu Glukonsäure). Dazu gehören Glukose-Oxidasen oder Glukose-Dehydrogenasen. Glukose-Oxidasen oxidieren Glukose zu Glukonolaktone unter Reduktion von molekularem Sauerstoff. Glukosedehydrogenasen oxidieren ebenfalls Glukose zu Glukonolaktone aber verwenden andere Elektronenakzeptoren wie Pyrroloquinolin-Quinon (PQQ) oder andere Cofaktoren wie Nicotinadenindinukleotid (NAD) oder NADP. Es ist bekannt, daß membrangebundene Glukosedehydrogenasen mit dem Cofaktor Pyrroloquinolin-Quinon (PQQ) Glukose oxidieren können, wobei der Umsatz an der Membranaußenseite erfolgt. Zur Aufnahme des Produkts (Glukonolaktone bzw. Glukonsäure) in die Zelle bedarf es dann eines eigenen Transportsystems, wie von van Schie et al. *Journal of Bacteriology* 163 (1985) 493–499; Isuriz et al. *Journal of General Microbiology* 132 (1986) 3209–3219; Izu et al. *Journal of Molecular Biology* 267 (1997) 778–793, beschrieben wurde, dessen Expression in der Regel (z. B. in *Escherichia coli*) durch die Gegenwart von Glukose reprimiert ist, wie von Izu et al. *Journal of Molecular Biology* 267 (1997) 778–793, und Conway. *FEMS Microbiology Reviews* 103 (1992) 1–27 beschrieben.

Glukosedehydrogenasen mit dem Cofaktor NAD oder NADP sind lösliche Enzyme, die innerhalb der Zelle vorkommen. Bekannte Produzenten sind u. a. *Bacillus*-Stämme, die z. T. über mehrere Isoenzyme der Glukosedehydrogenase verfügen können (z. B. Glukosedehydrogenasen I bis IV bei *Bacillus megaterium*; Mitamura et al. 1990. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 70, 363–369). Die Expression der Glukosedehydrogenasen ist strikt reguliert und erfolgt bekanntermaßen z. B. nur in Vorsporenstadien bei der Endosporenbildung von *Bacillus*-Arten; die physiologische Rolle der Glukosedehydrogenase beim Wachstum auf Glukose ist unklar, wie von Lampel et al. *Journal of Bacteriology* 166 (1986) 238–243, sowie von Steinmetz bzw. Fortnagel kürzlich beschrieben ("*Bacillus subtilis* and other Gram-positive Bacteria" (Sonenschein, Hoch und Losick, Hg.), M. Steinmetz pp. 157–170 und P. Fortnagel pp. 171–180; ISBN 1-55581-053-5; ASM Press, Washington, D.C., 1993).

Aus *Escherichia coli*, *Corynebakterien*, *Brevibakterien* u. a. sind bisher keine NAD(P)-abhängigen Glukosedehydrogenasen beschrieben worden. Gene für Glukosedehydrogenase(n) aus *Bacillus*-Stämmen wurden in *Escherichia coli* kloniert und dort ausgeprägt (Hilt et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1076 (1991) 298–304). Ziel dabei war vor allem die Gewinnung rekombinanter Glukosedehydrogenase, die als Nachweissystem für Glukose eingesetzt wurde bzw. zur Cofaktorregeneration (Hilt et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1076 (1991) 298–304; DE Patentanmeldung 37 11 881). Zur Verwertung von Glukose z. B. als Substrat für die Gewinnung von Substanzen wie aromatischen Aminosäuren wurden diese Gene dagegen bisher nicht beschrieben.

Erfindungsgemäß wurde festgestellt, daß das Einbringen oder die Erhöhung der Aktivität einer Glukosedehydrogenase überraschend zur Bildung von Substanzen führt. Eine Erhöhung der Aktivität eines Glukose-oxidierenden Enzyms führt zur intrazellulären Bildung von Glukonolaktone und Glukonsäure aus glukosehaltigen Substraten. In einer bevorzugten Ausführungsform stammt die Glukosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium*, insbesondere die Glukosedehydrogenase IV aus *Bacillus megaterium* wie beschrieben von Mitamura et al. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 70 (1990) 363–369, und Nagao et al. *Journal of Bacteriology* 15 (1992) 5013–5020.

Glukonsäure ist zur Aktivierung auf ein Glukonsäure-phosphorylierendes Enzym angewiesen. Es ist bekannt, daß solche Enzyme z. B. Phosphoenolpyruvat-abhängige Enzyme II mit Spezifität für Glukonsäure sein können, oder ATP-abhängige Kinasen mit Spezifität für Glukonsäure. Bekannt ist z. B. die ATP-abhängige Glukonatkinaise GntK aus *Escherichia coli* wie beschrieben von Izu et al. *FEBS Letters* 394 (1996) 14–16; Izu et al. *Journal of Molecular Biology* 267 (1997) 778–793, und Tong et al. *Journal of Bacteriology* 178 (1996) 3260–3269.

Das Produkt, 6-Phosphoglukonat, ist sowohl ein Intermediat des oxidativen Zweiges des Pentosephosphatweges als auch des Entner-Doudoroff-Weges in *Escherichia coli* wie beschrieben von Fraenkel, p. 189–198 in "Escherichia coli and Salmonella", 2. Auflage (Neidhardt et al. Hg.) ASM Press, Washington, USA, ISBN-1-55581-084-5, 1996.

Durch die zusätzliche Erhöhung der Aktivität eines Glukonsäure (Glukonat)-phosphorylierenden Enzyms kann die Produktion von Substanzen verbessert werden. Beim Einsatz eines Glukonsäure-phosphorylierenden Enzyms sind z. B. Glukonsäure-phosphorylierende Enzyme aus verschiedenen Mikroorganismen geeignet, vorausgesetzt, daß sie in den Mikroorganismen, insbesondere Substanzen produzierenden Mikroorganismen, funktionell exprimiert werden können. Es empfiehlt sich insbesondere der Einsatz einer ATP-abhängigen Glukonatkinaise, bevorzugt einer Glukonatkinaise aus *Escherichia coli*, insbesondere der Glukonatkinaise (GntK) aus *Escherichia coli* K-12. Andere Gene für Glukonsäure-phosphorylierende Enzyme, deren Genprodukte die Glukonsäure phosphorylieren, sind für das erfindungsgemäße Verfahren ebenso geeignet. Beispielhaft genannt seien Gene aus anderen Enterobakterien, *Zymomonas mobilis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*.

Die Wirkung von Glukonatkinaise beschränkt sich auf die Aktivierung von Glukonsäure/Glukonat, die aber z. B. in Gegenwart von Glukose nicht von *Escherichia coli* oder anderen Bakterien verstoffwechselt wird. Beispielsweise ist die Glukonatkinaise GntK in *Escherichia coli* nur beim Wachstum auf Glukonsäure von Bedeutung, trägt aber nicht zur Verstoffwechselung von Glukose bei, ja ihre Bildung ist sogar in Gegenwart von Glukose reprimiert, wie beschrieben von Izu et al. *Journal of Molecular Biology* 267 (1997) 778–793, und Tong et al. *Journal of Bacteriology* 178 (1996) 3260–3269, und erfolgt nicht in Gegenwart von Glukose.

In dieser besonderen Ausführungsform wird daher durch die zusätzliche, erhöhte Aktivität eines Glukonsäure-phosphorylierenden Enzyms, insbesondere einer Glukonatkinaise, am besten einer Glukonatkinaise aus *Escherichia coli* und insbesondere der Glukonatkinaise GntK aus *Escherichia coli* K-12, ein Enzym bereitgestellt, das in Substanzen produzierenden Mikroorganismen eine Bereitstellung eines Glukonsäure-phosphorylierenden Enzyms in Abwesenheit extrazellulären Glukonats bzw. in Anwesenheit von Glukose ermöglicht. Der Vorteil ist ein erhöhter Stofffluß über den alternativen Stoffwechselweg. Dies ermöglicht die verstärkte Umsetzung von Glukonsäure zu 6-Phosphoglukonat, sogar in An-

wesentlich von Glukose. Dies führt zu einer Erhöhung des intrazellulär vorliegenden Anteils an 6-Phosphoglukonat, welches über bekannte Stoffwechselsequenzen in Substanzen umgesetzt werden kann.

Ein Reaktionsprodukt des Glukose-oxidierenden Enzyms ist Glukonolakton. Glukonolakton kann sich spontan in Glukonsäure umwandeln, es sind aber auch Enzyme beschrieben, die diese Umwandlung katalysiert beschleunigen (Glukonolaktonase z. B. aus Zymomonas mobilis wie beschrieben von Kanagasundaram und Scopes Biochimica et Biophysica Acta 1171 (1992) 198–200). In einer weiteren Ausführungsform wird daher das Gen einer Glukonolaktionase (z. B. aus Zymomonas mobilis) zusätzlich zum Glukose-oxidierenden Enzym bzw. zum Glukose-oxidierenden Enzym und zum Glukonsäure-phosphorylierenden Enzym ausgeprägt, um die Umsetzung von Glukonolakton zu Glukonsäure (bzw. zu 6-P-Glukonat) zu beschleunigen.

Es sei bemerkt, daß in einigen *Bacillus*-Arten Gene für Glukosedehydrogenase und Glukonatkinaise natürlich vorkommen können; allerdings sind die Gene für die Enzyme in unterschiedlichen Operons angeordnet und werden offenbar nicht gemeinsam zur Verstoffwechslung von Glukose benutzt, wie von Steinmetz bzw. Fortnagel beschrieben ("*Bacillus subtilis and other Gram-positive Bacteria*" (Sonenschein, Hoch und Losick, Hg.), Steinmetz pp. 157–170 und Fortnagel pp. 171–180; ISBN 1-55581-053-5; ASM Press, Washington, D.C., 1993). Außerdem ist, wegen der spezifischen Induktion der Glukosedehydrogenasen unter Sporulationsbedingungen, nicht zu erwarten, daß die beiden Enzyme zusammen zur Bildung von Substanzen beitragen.

Folglich ist der im Rahmen dieser Erfindung beschriebene Effekt der erhöhten Aktivität eines Glukose-oxidierenden Enzyms, bzw. eines Glukose-oxidierenden Enzyms und eines Glukonsäure-phosphorylierenden Enzyms bei Wachstum auf Glukose oder glukosehaltigen Substraten für die Produktion von Substanzen, insbesondere aromatischen Aminosäuren, vollkommen unerwartet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird zusätzlich zur Erhöhung des Glukose-oxidierenden Enzyms oder des Glukose-oxidierenden Enzyms und des Glukonsäure-phosphorylierenden Enzyms die Aktivität eines Transportproteins zur PEP-unabhängigen Aufnahme eines Zuckers erhöht.

Diese Ausführungsform schließt auch ein, daß die Aktivität eines Transportproteins zur PEP-unabhängigen Aufnahme von Glukose bzw. von glukosehaltigen Substraten in einem Substanzen produzierenden Mikroorganismus erhöht wird, der zur Aufnahme des Zuckers mittels eines PEP-abhängigen Transportsystems befähigt ist. Die zusätzliche Integration eines pEP-unabhängigen Transportsystems erlaubt eine erhöhte Bereitstellung des Zuckers in dem die Substanzen produzierenden Mikroorganismus. Dieser Zucker kann erfindungsgemäß von einem intrazellulären Glukose-oxidierenden Enzym zu Glukonolakton und in der Folge Glukonsäure umgesetzt werden. Glukonsäure ist dann das Substrat für ein Glukonsäure-phosphorylierendes Enzym. Meistens wird PEP als Energie-Donor für diese Umsetzungen nicht benötigt und steht damit, ausgehend von einem konstanten Stofffluß in der Glykolyse und dem Pentosephosphatweg, vermehrt für die Kondensation mit Ery4p zum primären Metaboliten des allgemeinen Biosyntheseweges für aromatische Verbindungen, 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP), zur Verfügung und in der Folge für die Produktion von Substanzen, wie z. B. aromatischen Verbindungen.

Im Falle des Transportproteins wird Aktivität dabei als proteinvermittelte Aufnahmerate verstanden.

Bezüglich des Transportproteins zur PEP-unabhängigen Aufnahme von Glukose bzw. glukosehaltigen Substraten empfiehlt sich der Einsatz von Transportproteinen, insbesondere eines Facilitators, das heißt eines Transportproteins, das nach dem Prinzip der proteinvermittelten erleichterten Diffusion wirkt. Insbesondere bietet sich der Einsatz des Glukosefacilitator-Proteins (Glf) aus Zymomonas mobilis an. Bei der Verwendung von letzterem stammt das Protein kodierende Gen glf z. B. aus *Z. mobilis*, insbesondere das aus *Z. mobilis* ATCC 31821 isolierte Facilitator-Gen glf, wie beschrieben von Parker et al. 1995. Molecular Microbiology 15 (1995) 795–802, und Weisser et al. 1995. Journal of Bacteriology 177 (1995) 3351–3354. Andere Zuckertransportgene aus Bakterien, deren Genprodukte Glukose transportieren und dabei kein PEP verwenden, sind für das erfindungsgemäße Verfahren aber ebenso geeignet, wie z. B. das GalP-System aus *Escherichia coli*. Außerdem sind Gene für Zuckertransportsysteme wie HXT1 bis HXT7 aus eukaryontischen Mikroorganismen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* oder *Kluyveromyces lactis*, oder allgemein Zuckertransportgene aus anderen Organismen einsetzbar, vorausgesetzt, daß sie in den Mikroorganismen funktionell exprimiert werden können und die Genprodukte dabei ohne PEP zur Phosphorylierung und/oder zum Transport der Glukose auskommen. Insbesondere empfiehlt es sich, daß die Zuckertransportgene in Aminosäureproduzenten exprimiert werden können.

Als Maßnahmen zur Steigerung der Aktivität im Sinne der Erfindung sind alle Maßnahmen zu verstehen, die dazu geeignet sind, die Aktivität eines Glukose-oxidierenden Enzyms oder die Aktivität eines Glukose-oxidierenden Enzyms und zusätzlich mindestens eine Aktivität aus Glukonsäure-phosphorylierendem Enzym, Glukonolaktionase, Transportprotein zur PEP-unabhängigen Zuckeraufnahme zu steigern. Insbesondere sind hierzu geeignet:

- 55 – Einführung von Genen z. B. mittels Vektoren oder temperenter Phagen;
- Erhöhung der Genkopienzahl z. B. mittels Plasmiden mit dem Ziel die erfindungsgemäßen Gene in erhöhter Kopienzahl, von leicht (z. B. 2- bis 5fach) bis zu stark erhöhter Kopienzahl (z. B. 15- bis 50fach), in den Mikroorganismus einzubringen;
- Erhöhung der Genexpression z. B. durch Steigerung der Transkriptionsrate z. B. durch Verwendung von Promotorenlementen wie z. B. *P lac*, *P tet* oder anderen regulatorischen Nucleotidsequenzen und/oder durch Steigerung der Translationsrate z. B. durch Verwendung einer Konsensus-ribosomenbindungsstelle;
- Erhöhung der endogenen Aktivität von vorhandenen Enzymen z. B. durch Mutationen, die nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder mutationsauslösenden Chemikalien, oder durch Mutationen, die gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletion(en), Insertion(en) und/oder Nucleotidaustausch(e) erzeugt werden;
- Erhöhung der Aktivität von Enzymen durch Veränderung der Struktur von Enzymen z. B. durch Mutagenese mit physikalischen, chemischen, molekularbiologischen oder sonstigen mikrobiologischen Methoden;
- Verwendung von deregulierten Enzymen, z. B. nicht mehr feedback inhibuierten Enzymen;

- Einführung entsprechender die deregulierten Enzyme kodierenden Gene.

Auch Kombinationen der genannten und weiteren, analogen Methoden können zur Erhöhung der Aktivität eingesetzt werden. Im Falle von Transportproteinen kann die endogene Aktivität erhöht werden z. B. durch Klonierung des Gens mit beispielsweise o.g. Methoden oder über Selektion von Mutanten mit erhöhtem Transport von Substraten.

Bevorzugt erfolgt die Steigerung der Aktivität dadurch, daß eine Integration des Gens oder der Gene in eine Genstruktur oder in mehrere Genstrukturen erfolgt, wobei das Gen oder die Gene als einzelne Kopie oder in erhöhter Kopienzahl in die Genstruktur eingebracht wird.

Als Genstruktur im Sinne der Erfindung ist ein Gen und jede Nucleotidsequenz zu verstehen, die die erfundungsgemäßigen Gene trägt. Entsprechende Nucleotidsequenzen können beispielsweise Plasmide, Vektoren, Chromosomen, Phagen oder andere, nicht zirkulär geschlossene, Nucleotidsequenzen sein.

In Mikroorganismen, in denen der Stofffluß nach Ery4p erhöht ist, kann die Verfügbarkeit von PEP zur Produktion des ersten Intermediates des aromatischen Aminosäurestoffwechsels limitiert sein. In solchen Fällen kann es vorteilhaft sein, andere PEP-verbrauchende Reaktionen im Metabolismus, wie z. B. die Reaktion des PEP : Zucker-Phosphotransferase-systems (PTS), welches eine PEP-abhängige Zuckeraufnahme katalysiert, sofern anwesend, zu vermindern oder auszuschalten.

Erfundungsgemäß können sowohl Organismen eingesetzt werden, die das natürliche Aktivitätsniveau des PTS aufweisen; es können auch, zur weiteren Verbesserung des Verfahrens, PTS-Mutanten eingesetzt werden, in denen das PTS in seiner Aktivität vermindert ist. Eine derartige Verminderung kann entweder auf enzymatischer Ebene oder durch genetische Methoden erfolgen, z. B. durch Verwendung alternativer, stark reprimierbarer Promotoren zur Expression der pts-Gene, oder durch Insertion eines gfp-Gens in das Chromosom und insbesondere in den Genort des ptsI-Gens, was zugeleich eine Stabilisierung der rekombinanten DNS im Chromosom (Segregationsstabilität) und damit den Verzicht auf die Verwendung eines Vektors mit sich bringt. Des Weiteren kann in Verbindung mit einem regulierbaren Promotor auch durch die Zugabe von Induktoren oder Inhibitoren des entsprechenden Promoters während der Kultivierung Einfluß auf die Aktivität des PTS genommen werden.

Im erfundungsgemäßen Verfahren zur Produktion von Substanzen werden bevorzugt Mikroorganismen eingesetzt, in denen ein oder mehrere Enzyme, die zusätzlich an der Synthese der Substanzen beteiligt sind, dereguliert und/oder in ihrer Aktivität erhöht sind.

Dies sind insbesondere die Enzyme des aromatischen Aminosäurestoffwechsels und vor allem DAHP-Synthase, Shikimatkinaise und Chorismatmutase/Prephenatdehydratase, sowie aber auch alle anderen Enzyme, insbesondere auch Transaldolase, Transketolase und Glukokinase, die an der Synthese aromatischer Stoffwechselintermediate und deren Folgeprodukte beteiligt sind.

Für die Herstellung von Substanzen wie beispielsweise Adipinsäure, Gallensäure und Chinonverbindungen, sowie deren Derivate ist neben den erfundungsmäßigen Enzymen besonders die Deregulation und Überexpression der DAHP-Syntase von Bedeutung. Zur überhöhten Synthese von beispielsweise L-Tryptophan, L-Tyrosin, Indigo, Derivaten von Hydroxy- und Aminobenzoësäure und Naphtho- und Anthraquinonen, sowie deren Folgeprodukten sollte zusätzlich die Shikimatkinaise dereguliert und in ihrer Aktivität erhöht werden. Für eine effiziente Produktion von Phenylalanin, Phenylbrenztraubensäure und deren Derivaten ist zusätzlich eine deregulierte und überexprimierte Chorismatmutase/Prephenatdehydratase von besonderer Bedeutung. Jedoch sollen damit auch alle anderen Enzyme umfaßt sein, deren Aktivitäten zur biochemischen Synthese von Substanzen beitragen, das heißt Verbindungen deren Produktion durch die Bereitstellung von Ery4P oder Ery4P und PEP begünstigt wird.

Es sei bemerkt, daß für die Herstellung von Indigo, Adipinsäure und anderen nicht natürlichen Folgeprodukten neben den erfundungsgemäßen Eingriffen weitere genetische Veränderungen an den Substanzen produzierenden Mikroorganismen notwendig sind. Diese Maßnahmen sind dem Fachmann bekannt (Frost & Draths, Ann. Rev. Microbiol. 49 (1995) 557-579).

Das erfundungsgemäße Verfahren eignet sich zur Herstellung von aromatischen Aminosäuren, insbesondere von L-Phenylalanin. Im Falle von L-Phenylalanin wird dabei vorzugsweise die Genexpression und/oder die Enzymaktivität einer deregulierten DAHP-Synthase (z. B. in *E. coli* AroF oder AroH) und/oder einer ebenfalls deregulierten Chorismatmutase-/Prephenatdehydratase (PheA) erhöht.

Als Produktionsorganismen eignen sich *Escherichia*-Arten, sowie aber auch Mikroorganismen der Gattungen *Serratia*, *Bacillus*, *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* und weitere aus klassischen Aminosäureverfahren bekannte Stämme. Besonders Bakterien aus den Familien *Nocardiaceae* und *Actinomycetales*. Besonders geeignet ist *Escherichia coli*.

Die Erfindung betrifft auch die Bereitstellung von geeigneten Genstrukturen und diese Genstrukturen tragenden transformierten Zellen, welche eine besonders erfolgreiche Realisation des Verfahrens ermöglichen.

Im Rahmen der Erfindung werden jetzt neue Genstrukturen zur Verfügung gestellt, die, in rekombinanter Form, entweder ein Gen enthalten, kodierend für ein Glukose-oxidierendes Enzym a) zusammen mit einem Gen kodierend für ein Glukonsäure-phosphorylierendes Enzym oder b) zusammen mit einem Gen kodierend für ein Transportprotein zur PEP-unabhängigen Aufnahme eines Zuckers oder c) zusammen mit mindestens zwei der drei nachstehenden Gene kodierend für ein Glukonsäure-phosphorylierendes Enzym, für eine Glukonolaktone, oder für ein Transportprotein zur PEP-unabhängigen Aufnahme eines Zuckers.

Insbesondere kodiert das Gen für das Glukose-oxidierende Enzym für eine Glukosedehydrogenase und das Gen für das Glukonsäure-phosphorylierende Enzym für eine Glukonatkinase.

Das Gen für die Glukosedehydrogenase stammt bevorzugt aus *Bacillus megaterium*, das Gen für die Glukonatkinase aus *Escherichia coli* und die Gene für Glukonolaktone und das Transportprotein aus *Zymomonas mobilis*. Besonders vorteilhaft sind Genstrukturen, bei denen das Gen für die Glukose-dehydrogenase die Glukosedehydrogenase IV (gdhIV) aus *Bacillus megaterium*, das Gen gntK für die Glukonatkinase die GntK aus *Escherichia coli*, die Gene für das Transportprotein und die Glukonolaktone die Gene gfp und gnl aus *Zymomonas mobilis* sind.

Die Isolierung der entsprechenden Gene und die Transformation der Zellen erfolgt nach gängigen Methoden: Im Falle

DE 198 18 541 A 1

z. B. der Klonierung des Glukonatkinasegens *gntK* aus *E. coli*, der Glukosedehydrogenase IV (*gdhIV*) aus *Bacillus megaterium*, der Glukonolaktonase (*gnl*) oder des Transportgens *glf* aus *Zymomonas mobilis* eignet sich beispielsweise die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur gerichteten Amplifikation des Gens mit chromosomaler DNS aus Escherichia coli K-12 (*gntK*), *Bacillus megaterium* (*gdhIV*) bzw. *Zymomonas mobilis* Stämmen ATCC 29191 oder 5 ATCC 31821 (*gnl*, *glf*). Nach Amplifikation der DNS und deren in vitro-Rekombination mit bekannten Vektoren (*pGEM7*, *pUCBM20*, *pUC19* oder anderen) erfolgt die Transformation der Wirtszelle durch chemische Methoden, Elektroporation, Transduktion oder Konjugation.

Im Falle der Gene *gntK*, *gdhIV*, *gnl* und *glf* aus den 3 Spenderorganismen sind die vollständigen Nucleotidsequenzen bekannt und aus allgemein zugänglichen Quellen erhältlich z. B. in Datenbanken wie beim EMBL/HUSAR in Heidelberg unter den Zugangsnummern D 84362 (*gntK*), D 10626 (*gdhIV*), X 67189 (*gnl*) und M 60615 (*glf*) hinterlegt. Im Falle der Klonierung des *gntK*-Gens aus Escherichia coli eignet sich die PCR zur gerichteten Amplifikation des Gens mit 10 chromosomaler DNS aus Escherichia coli K-12 Stämmen anhand der Gen-Sequenzen wie beschrieben von Izu et al. Journal of Molecular Biology 267 (1997) 778-793, und Tong et al. Journal of Bacteriology 178 (1996) 3260-3269. Im Falle der Klonierung des *gdhIV*-Gens aus *Bacillus megaterium* eignet sich beispielsweise chromosomaler DNS aus 15 *Bacillus megaterium* (Nagao et al., Journal of Bacteriology 174 (1992) 5013-5020).

Das isolierte Glukosedehydrogenase IV-Gen kann mit einem oder mehreren der im Rahmen der Erfindung beschriebenen Gene in jeglicher Kombination in eine Genstruktur oder in mehrere Genstrukturen integriert werden. Ohne die genaue Verteilung auf Genstrukturen zu berücksichtigen, führt dies zu Kombinationen wie z. B. *gdhIV* + *gntK*, *gdhIV* + *glf*, *gdhIV* + *gntK* + *glf*; *gdhIV* + *gntK* + *gnl*; *gdhIV* + *gnl* + *glf*; *gdhIV* + *gntK* + *gnl* + *glf*.

Bei der Verteilung der Gene wird *glf* vorzugsweise in niedriger Kopienzahl x (wie beispielsweise x = 1 bis 10) in die Genstruktur oder die Genstrukturen eingebracht, um mögliche negative Auswirkungen einer Überexpression eines Membranproteins zu vermeiden.

Vorteilhaft sind Genstrukturen, die mindestens eine, einem der Gene zugeordnete, regulatorische Gensequenz enthalten.

So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die Transkriptionssignale verstärkt werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß durch Veränderung der den Strukturgencn vorgesetzten Promotorssequenzen die Wirksamkeit des Promoters oder der Promotoren erhöht wird oder indem die Promotoren komplett durch wirksamere Promotoren ersetzt werden.

Auch kann eine Verstärkung der Transkription durch entsprechende Beeinflussung eines den Genen zugeordneten Regulatorgens erfolgen; daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der Boten-RNS (m-RNS) verbessert wird.

Weiterhin werden im Rahmen der Erfindung auch transformierte Zellen bereitgestellt, die in replizierbarer Form eine erfindungsgemäße Genstruktur enthalten.

Als transformierte Zelle im Sinne der Erfindung ist jeder Mikroorganismus zu verstehen, der eine erfindungsgemäße Genstruktur trägt, die die verstärkte Bildung von Substanzen in der Zelle bewirkt. Die Transformation der Wirtszellen kann durch chemische Methoden (Hanahan J. Mol. Biol. 166 (1983) 557-580), sowie auch durch Elektroporation, Konjugation oder Transduktion erfolgen.

Es ist vorteilhaft für die Transformation Wirtszellen einzusetzen, in denen ein oder mehrere Enzyme, die zusätzlich an der Synthese der Substanzen beteiligt sind, dereguliert und/oder in ihrer Aktivität erhöht sind.

Mit der die jeweiligen Gene enthaltenden Genstruktur wird ein, eine aromatische Aminosäure oder eine andere erfindungsgemäße Substanz produzierender Mikroorganismus-Stamm, insbesondere Escherichia coli, transformiert.

Es ist von Vorteil für die Transformation mit den Genstrukturen Wirtszellen einzusetzen, in denen zusätzlich, sofern anwesend, das PEP-abhängige Zuckeraufnahmesystem in seiner Aktivität vermindert oder ausgeschaltet ist.

Insbesondere werden transformierte Zellen bereitgestellt, die in der Lage sind, eine aromatische Aminosäure zu produzieren, wobei die aromatische Aminosäure vorzugsweise L-Phenylalanin ist.

Es wird also ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Substanzen bereitgestellt, bei dem transformierte Zellen, wie oben beschrieben, enthaltend Genstrukturen, wie oben beschrieben, eingesetzt werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden transformierte Zellen eingesetzt, die außer Ery4P auch andere Zentralstoffwechselmetabolite in erhöhter Verfügbarkeit enthalten.

Dazu zählen z. B. α -Oxoglutarat oder Oxalacetat, die aus intrazellulären Syntheseprozessen resultieren, oder aber durch Zufütterung der entsprechenden Substanzen, oder ihrer Vorläufer, wie z. B. Fumarat oder Malat als Metaboliten des Zitronensäurezyklus, den wachsenden Zellen zur Verfügung gestellt werden.

Bei DSMZ ist unter den Bedingungen des Budapest Vertrages der Stamm Escherichia coli AT2471/pGEM7gntKgdhIV unter der Hinterlegungsnummer DSM 12118 am 15. 04. 1998 hinterlegt worden.

Der verwendete Wirtsorganismus AT2471 wurde von Taylor und Trotter (Bacteriol. Rev. 13 (1967) 332-53) bei der CGSC unter der Nummer 4510 hinterlegt und ist frei erhältlich.

Im Folgenden sollen die verwendeten Materialien und Methoden angegeben, sowie die Erfindung durch experimentelle Beispiele und Vergleichsbeispiele unterbaut werden:

60

Allgemeine Methoden

Im Rahmen der genetischen Arbeiten wurden Stämme von *E. coli*, sofern nicht anderweitig erwähnt, auf LB-Medium bestehend aus Difco Bacto Trypton ($10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), Difco-Hefeextrakt ($5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) und NaCl ($10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) kultiviert. In Abhängigkeit von den Resistenzeigenschaften der verwendeten Stämme wurde, sofern nötig, dem Medium bzw. Ampicillin ($100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) und Chloramphenicol ($17-34 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) zugesetzt. Ampicillin wurde dabei zuvor in Wasser und Chloramphenicol in Ethanol gelöst und dem bereits autoklavierten Medium sterilfiltriert zugegeben. Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem LB-Medium Difco Bacto Agar (1,5%) zugesetzt.

Plasmid-DNS aus *E. coli* wurde mittels alkalischer Lyse unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Systems

DE 198 18 541 A 1

(Qiagen, Hilden) isoliert. Die Isolation von chromosomaler DNS aus *E. coli* und *Bacillus megaterium* DSM 319 erfolgte nach Chen und Kuo (Nucl. Acid Res. 21 (1993) 2260). Die Verwendung von Restriktionsenzymen, Taq-DNS-Polymerase, DNS-Polymerase I, Alkalische Phosphatase, RNase und T4 DNS-Ligase erfolgte nach den Instruktionen der Produzenten (Boehringer, Mannheim, D oder Promega, Heidelberg, D). Zur Restriktionsanalyse wurden die DNS-Fragmente in Agarosegelen (0.8%) aufgetrennt und mittels Extraktion unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Systems (QuiaExII, Hilden, D) aus Agarose isoliert.

Zur Transformation der Zellen wurden diese für 2,5–3 h in LB-Medium (5 ml-Röhrchen) bei 37°C und 200 U · min⁻¹ inkubiert. Bei einer optischen Dichte (620 nm) von ca. 0,4 wurden die Zellen abzentrifugiert und in einem Zehntel des Volumens in TSS (LB-Medium mit 10% (w/v) PEG 8000, 5% (v/v) DMSO und 50 mM MgCl₂) aufgenommen.

Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C mit 0,1 bis 100 ng DNS und anschließender Inkubation bei 37°C für 1 h wurden die Zellen auf LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

Beispiel 1

Bereitung von pGEM7gntKgdhIV als Vorbild erfindungsgemäßer plasmidbasierter Genstrukturen

Die Klonierung des Gens gdhIV aus *Bacillus megaterium* DSM 319 kodierend für die Glukosedehydrogenase IV erfolgte nach spezifischer Amplifikation der chromosomalen DNS von *Bacillus megaterium* DSM 319 mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) aufgrund der bekannten DNS-Sequenz des Gens, die von Nagao et al. Journal of Bacteriology 15 (1992) 5013–5020 beschrieben wurde. Die PCR-Oligonukleotidprimer wurden mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI (5'Ende) bzw. SacI (3'Ende) versehen. Primer 1 (BamHI) bestand aus 5' ATG GAT CCA TGA AAA CAC TAG GAG GAT TTT 3'. Primer 2 (Sac I) bestand aus 5' GCC AGA GCT CTT TTT TCC ACA TCG ATT AAA AAC TAT 3' und war komplementär zum 3'Ende des gdhIV-Gens. Das erhaltene DNS-Amplifikationsprodukt von ca. 800 Basenpaaren wurde mit BamHI plus SacI restriktiert und danach in den gleichermaßen behandelten Vektor pGEM7 (s. Tab. 1) ligiert. Transformation erfolgte in den Stamm JM109DE3 mit Selektion auf LB-Agarplatten, die X-Gal und Ampicillin enthielten. Der Nachweis der erfolgreichen Klonierung erfolgte durch die Bestimmung der DNS-Sequenz des klonierten Gens gdhIV. Dieser Vektor (pGEM7gdtIV) ermöglichte auch in Abwesenheit des T7-Polymerasesystems (Stamm JM109DE3) die Expression der Glukosedehydrogenase IV-Aktivität (s. Tab. 2).

Die Klonierung des Gens gntK für die Glukonatkinaise GntK aus *Escherichia coli* K-12 erfolgte durch spezifische DNS-Amplifikation ausgehend von Stamm *E. coli* K-12 W3110 als chromosomal Matrize. Die Sequenz des gntK-Gens wurde von Tong et al. Journal of Bacteriology 178 (1996) 3260–3269 beschrieben. Zur Vermehrung mittels PCR wurden Oligonukleotidprimer gewählt, die zusätzlich mit Restriktionsschnittstellen für EcoRI (5') bzw. BamHI (3') versehen wurden. Primer 1 bestand aus 5'CCG AAT TCT TGT ATT GTG GGG GCA C 3' und bindet 5' stromaufwärts vom gntK-Gen; Primer 2 bestand aus 5'CCG GAT CCG TTA ATG TAG TCA CTA CTT A 3' und ist komplementär zum 3'Ende des gntK-Gens. Das Amplifikationsprodukt von ca. 600 Basenpaaren wurde gereinigt, mit EcoRI plus BamHI restriktiert und in den gleichermaßen geöffneten Vektor pGEM7 ligiert. Transformation erfolgte in den Stamm JM109DE3 mit Selektion auf LB-Agarplatten, die X-Gal und Ampicillin enthielten. Der Nachweis der erfolgreichen Klonierung erfolgte durch die Bestimmung der DNS-Sequenz des klonierten Gens gntK. Dieser Vektor (pGEM7gntK) ermöglichte auch in Abwesenheit des T7-Polymerasesystems (Stamm JM109DE3) die Expression der Glukonatkinaise-Aktivität (s. Tab. 2).

Die Kombination der Gene gntK und gdhIV erfolgte durch Öffnung des Vektors pGEM7gntK durch doppelte Restriktion mit BamHI plus SacI. In diesen dermaßen geöffneten Vektor wurde ein 800 Basenpaarfragment, das nach Restriktion des Vektors pGEM7gdtIV gewonnen worden war und das das gdhIV-Gen enthielt, ligiert. Transformation erfolgte wiederum mit Selektion auf Ampicillin. Die neue, erfindungsgemäße Genstruktur pGEM7gntKgdhIV vermittelte die T7 Polymerase-unabhängige Expression der Enzymaktivitäten für Glukosedehydrogenase IV und für Glukonatkinaise GntK (s. Tab. 2).

Die Aufbewahrung der erhaltenen Transformanden erfolgte auf LB-Medium in Form von Glycerinkulturen (30%) bei -80°C. Bei Bedarf wurden die Glycerinkulturen direkt vor dem Gebrauch aufgetaut.

Beispiel 2

Bestimmung der Enzymaktivitäten von Glukosedehydrogenase und Glukonatkinaise

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten in bakteriellen Rohextrakten wurden die Zellen von *E. coli* sowie von plasmidtragenden Mutanten in mineralischem Medium kultiviert. Dies bestand aus Natriumcitrat · 3 H₂O (1,0 g · l⁻¹), MgSO₄ · 7 H₂O (0,3 g · l⁻¹), KH₂PO₄ (3,0 g · l⁻¹), K₂HPO₄ (12,0 g · l⁻¹), NaCl 0,1 (g · l⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (5,0 g · l⁻¹), CaCl₂ · 2 H₂O (15,0 mg · l⁻¹), FeSO₄ · 7 H₂O (0,075 g · l⁻¹), und L-Tyrosin (0,04 g · l⁻¹). Die Zugabe weiterer Minerale erfolgte über eine Spurenelementlösung (1 ml · l⁻¹) zusammengesetzt aus Al₂(SO₄)₃ · 18 H₂O (2,0 g · l⁻¹), CoSO₄ · 6 H₂O (0,7 g · l⁻¹), CuSO₄ · 5 H₂O (2,5 g · l⁻¹), H₃BO₃ (0,5 mg · l⁻¹), MnCl₂ · 4 H₂O (20,0 g · l⁻¹), Na₂MoO₄ · 2 H₂O (3,0 g · l⁻¹), NiSO₄ · 3 H₂O (2,0 g · l⁻¹) und ZnSO₄ · 7 H₂O (15,0 g · l⁻¹). Vitamin B1 (5,0 mg · l⁻¹) wurde in Wasser gelöst und dem Medium nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugegeben, ebenso wie bei Bedarf Ampicillin bzw. Ampicillin und Chloramphenicol. Glukose (30 g · l⁻¹) wurde separat autoklaviert und dem Medium ebenfalls nach dem Autoklavieren zugefügt.

Die geernteten Zellen wurden in 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) gewaschen. Die Zellen des Sediments wurden mittels Ultraschall (Branson Sonifier 250 mit Microtip) in einem Beschallungszyklus von 25% und mit einer Intensität von 40 Watt für 4 min pro ml Zellsuspension aufgeschlossen. Nach Zentrifugation für 30 min bei 18000 g und 4 °C wurde der Überstand (Rohextrakt) für die Messung der Aktivität der Glukosedehydrogenase bzw. der Glukonatkinaise verwendet.

Die Bestimmung der Aktivität der Glukosedehydrogenase erfolgte nach Harwood & Cutting. Molecular Biological

Methods für Bacillus. John Wiley & Sons. Glukosedehydrogenase katalysiert die Oxidation von Glukose zu Glukonolakton. Die Aktivität des Enzyms wurde über die Zunahme der Konzentration des reduzierten Cofaktors NADH + H⁺ photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt. Die Bestimmung erfolgte in Quarzküvetten mit einem Gesamtvolumen von 1 ml. Der Reaktionsansatz bestand aus Tris HCl Endkonzentration 250 mM pH 8.0), Natrium-EDTA 5 2.5 mM, KCl 100 mM und NAD 2 mM. Rohextrakt wurde im Puffer 5 Minuten bei 25°C vorinkubiert. Zum Start der Nachweisreaktion wurde Glukose zugegeben (Endkonzentration 100 mM). Die Zunahme der Extinktion wurde bei 340 nm verfolgt. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne Glukose. Die spezifische Glukosedehydrogenase-Aktivität wird angegeben in U/mg, definiert als die Bildung von 1 µmol NADH pro Minute und mg Protein, was äquivalent zum Umsatz von 1 µmol Glukose pro Minute und mg Protein gesetzt wird.

10 Die Bestimmung der Glukonatkinase im Rohextrakt erfolgte wie von Izu et al. FEBS Letters 394 (1996) 14–16 beschrieben.

Glukonatkinase katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung von Glukonat zu 6-Phosphoglukonat. Das gebildete 6-Phosphoglukonat wird im Enzymtest durch das NADP-abhängige Hilfsenzym 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (Boehringer Mannheim, No. 108 405) über die Zunahme der NADPH-Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt. Die Bildung von 1 µmol NADPH entspricht dabei der Phosphorylierung von 1 µmol Glukonat. Der enzymatische Nachweis wurde in Quarzküvetten mit einem Gesamtvolumen von 1 ml durchgeführt bei 25°C 15 durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt Tris HCl 50 mM pH 8.0, ATP 100 mM, NADP 0.25 mM, 1.2 Einheiten des Hilfsenzymes 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase und variable Mengen an Rohextrakt. Die Ansätze wurden bei 25°C für 5 Minuten vorinkubiert und durch Zugabe von Glukonsäure (pH 6.8; Endkonzentration 10 mM im Ansatz) gestartet. Als 20 Kontrolle dienten Ansätze ohne Zugabe von Glukonsäure.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Rohextrakt erfolgte nach Bradford M. M. (Anal. Biochem. 72 (1976) 248–254) unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Farbreagenzes. Als Standard wurde Rinderserumalbumin verwendet.

25 Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der Enzymmessungen bei der Verwendung des Wirtsstammes *E. coli* W3110, sowie dessen Mutanten, die die Plasmide pGEM7gdhIV, pGEM7gntK oder pGEM7gntKgdhIV beinhalten. Es zeigte sich das die Enzyme bei der Verwendung der beschriebenen und erfundungsgemäßen Genstrukturen in erfundungsgemäßen Zellen funktionsfähig exprimiert werden können.

Beispiel 3

30 Produktion von Substanzen unter Verwendung von Stämmen, die eine erhöhte Aktivität der Glukosedehydrogenase aufweisen

Die Syntheseleistung von *Escherichia coli* AT2471 und *Escherichia coli* AT2471/pGEM7ghdIV wurde in dem unter 35 Beispiel 2 beschriebenen Mineralmedium bestimmt. Hierfür wurden Schüttelkolben (1000 ml mit 100 ml Medium) mit 2 ml Glycerinkultur angeimpft und bei 37°C und 150 U · min⁻¹ für 72 h auf einem Kreisschüttler inkubiert. In Intervallen von ungefähr 12 h wurde der pH-Wert der Kulturen gemessen und bei Bedarf durch Zugabe von KOH (45%) auf den Startwert von 7.2 zurückgebracht. Des Weiteren wurden nach 24 und 48 h Proben (2 ml) zur Bestimmung der optischen Dichte, sowie der Glukose- und der L-Phenylalaninkonzentrationen genommen.

40 Die Phenylalaninkonzentration wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC, Hewlett Packard, München, D) in Verbindung mit Fluoreszenzdetektion (Extinktion 335 nm, Emission 570 nm) ermittelt. Als feste Phase wurde eine Nucleosil-120-8-C18-Säule (250 4.6 mm) verwendet; die Elution erfolgte unter Verwendung eines Gradienten (Eluent A: 90% 50 mM Phosphorsäure, 10% Methanol, pH 2.5; Eluent B: 20% 50 mM Phosphorsäure, 80% Methanol, pH 2.5; Gradient: 0–8 min 100% A, 8–13 min 0% A, 13–19 min 100% A). Die Elutionsgeschwindigkeit wurde auf 1,0 ml · min⁻¹ festgesetzt; die Säulentemperatur auf 40°C. Die Nachsäulenderivatisierung erfolgte unter Verwendung von o-Phtaldialdehyd in einer Reaktionskapillare (14 m · 0.35 mm) bei Raumtemperatur. Für L-Phenylalanin wurde unter den beschriebenen Bedingungen eine Retentionszeit von 6,7 min ermittelt.

Durch die Messung der Glukosekonzentration mittels enzymatischer Teststreifen (Diabur, Boehringer Mannheim, D) und, abhängig von den Resultaten, Nachdosieren von 2 ml einer konzentrierten Glukoselösung (500 g · l⁻¹) wurde sicher gestellt, daß keine Glukoselimitierung in den Versuchsansätzen auftrat.

Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde im Vergleich zu einem (Phenylalanin)-Indexwert von 100 für den Wirtsstamm *E. coli* AT2471, durch das alleinige Einbringen des Plasmides pGEM7gdhIV ein die Phenylalaninekonzentration beschreibender Indexwert von 145 erreicht. Dieses Ergebnis zeigt den erfundungsgemäßen, die Synthese aromatischer Verbindungen erhöhenden Effekt der Erhöhung der Aktivität einer Glukosedehydrogenase in Substanzen produzierenden Mikroorganismen.

Beispiel 4

60 Produktion von Substanzen unter Verwendung von Stämmen, in denen zusätzlich zu einer erhöhten Aktivität der Glukosedehydrogenase ein PEP-unabhängiges Zuckeraufnahmesystem exprimiert ist

Das glf-Gen aus *Zymomonas mobilis* wurde unter Verwendung des Plasmids pZY600 (Weisser et al. J. Bacteriol 177 65 (1995) 3351–3345) als Matrize amplifiziert. Dabei wurde durch die Wahl der Primer eine BamHI- und eine KpnI-Schnittstelle eingeführt. Unter Verwendung dieser singulären Schnittstellen wurden das Gen in den Vektor pUCBM20 (Boehringer Mannheim), der ebenfalls mit BamHI und KpnI geöffnet worden war, eingebracht. Aus diesem Vektor (pBM20glf) wurde durch Restriktion mit BamHI und HindIII ein 1.5 kb großes DNS-Fragment gewonnen und mit dem Vektor Plasmid pZY507 (Weisser et al. J. Bacteriol 177 (1995) 3351–3345), der ebenfalls mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII geöffnet worden war, ligiert. Nach Transformation von *E. coli* und Klonierung der Transformanden

DE 198 18 541 A 1

wurde das rekombinierte Plasmid pZY507glf erhalten. Dieser Vektor führt zur Chloramphenicol-Resistenz, enthält das lacI^q-lac-Promotorsystem und hat eine niedrige Kopienzahl.

Der Vektor pZY507glf wurde zusammen mit den erfundungsgemäßen Genstrukturen aus Beispiel 1 in den Wirtsstamm AT2471 transformiert.

Den für Beispiel 3 beschriebenen experimentellen Bedingungen folgend, wurden die Mutanten E. coli AT2471glf, E. coli AT2471glf/pGEM7, E. coli AT2471glf/pGEM7gntK und E. coli AT2471glf/pGEM7gntKgdhIV in je zwei Parallelansätzen kultiviert. Nach 48 h wurde die L-Phenylalaninkonzentration im Medium bestimmt.

Im Vergleich zum Ausgangsstamm E. coli AT2471glf, der eine dem Indexwert von 100 entsprechende L-Phenylalaninkonzentration erreichte, ermöglichte die Anwesenheit des Vektors pGEM7 einen Indexwert von 96 und damit nahezu identische Konzentrationen. Der Einsatz von E. coli AT2471glf/pGEM7gntK hingegen erlaubt eine L-Phenylalaninkonzentration, die im Vergleich zu den zuvor genannten Stämmen einem Indexwert von 179 entsprach. Eine weitere Erhöhung auf einen die Phenylalaninkonzentration repräsentierenden Indexwert von 195 ermöglichte die Expression beider Gene des alternativen Stoffwechsels, d. h. Glukosedehydrogenase und Glukonatkinase in E. coli AT2471glf/pGEM7gntKgdhIV. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Expression eines alternativen Stoffwechselweges durch Einbringen der Aktivität der Glukosedehydrogenase und Erhöhen der Aktivität der Glukonatkinase die Synthese von L-Phenylalanin gerade in jenen Mikroorganismen positiv beeinflußt, in denen gleichzeitig ein PEP-unabhängiges Zuckeraufnahmesystem transformiert und exprimiert ist.

Beispiel 5

Produktion von Substanzen unter Verwendung von PTS⁻-Mutanten, in denen zusätzlich zu einer erhöhten Aktivität der Glukosedehydrogenase ein PEP-unabhängiges Zuckeraufnahmesystem exprimiert ist

Zur Integration des glf-Gens in die Gene, die für Komponenten des PTS-Systems von E. coli kodieren, wurde das Plasmid pPTS1 mit BglII verdaul und mit Klenow-Fragment behandelt. Die singuläre Schnittstelle liegt im ptsI-Gen. Das glf-Gen wurde als BamHI-KpnI-Fragment aus dem Plasmid pBM20glfglk isoliert und ebenfalls mit Klenow-Fragment behandelt. Durch blunt-end-Ligation wurden Klone erhalten, die das glf in gleicher Orientierung wie die Gencs ptsHI tragen. Aus dem resultierenden Plasmid pPTSglf konnte ein 4,6 kb PstI-Fragment erhalten werden, welches den 3'-Bereich des ptsH-Gens sowie ptsI mit integriertem glf und crr trägt. Dieses Fragment wurde in die EcoRV-Schnittstelle des Vektors pGP704 ligiert. Da dieser Vektor nur in λpir-Stämmen repliziert werden kann, haben Transformanden, die diesen Phagen nicht tragen, den Vektor ins Chromosom integriert, wenn sie auf Carbenicillin wachsen können. Die Integration wurde mittels Southern Analyse überprüft (Miller V. L. et al., J. Bacteriol. 170 (1988) 2575-83). Die erhaltenen Transformanden enthielten neben dem glf-Gen auch die vollständigen PTS-Gene.

Bei einem zweiten homologen crossover kann der Vektoranteil herausre kombinieren, was zum Verlust der Carbenicillin-Resistenz führt. Da in diesem Falle die pts-Gene durch die Insertion des glf-Gens unterbrochen vorliegen, wird das PTS in diesen Mutanten nicht funktionell exprimiert. Die gewünschten PTS⁻-Mutanten wurden wie folgt selektiert: Nach mehrmaligem Überimpfen der noch PTS⁺-Transformanden auf LB-Medium ohne Antibiotika wurden Aliquots der Zellsuspension auf LB-Platten mit 100 µg · l⁻¹ Phosphomycin ausplattiert. PTS⁻-Mutanten können auf diesen Platten wachsen. Wachsende Klone wurden auf LB-Platten mit entweder Phosphomycin oder mit 20 µg · l⁻¹ Carbenicillin ausgestrichen. Von Klonen, die erneutes Wachstum auf den Phosphomycin-Platten, nicht aber auf den Carbenicillin Platten zeigten, wurde chromosomal DNS isoliert. Die Integration des glf-Gens in die Gene, die für das PTS-System kodieren, wurde durch Southern-Analyse bestätigt. Entsprechende Mutanten wurden als phänotypisch PTS-defizient identifiziert.)

Ein Klon wurde als Wirtsorganismus E. coli AT2471glfintPTS⁻ ausgewählt und für die Transformationen (s. oben) mit Plasmid pGEM7gntKgdhIV eingesetzt.

Den für Beispiel 3 und 4 beschriebenen experimentellen Bedingungen folgend, wurden die PTS-negative Mutante E. coli AT2471glfintPTS⁻/pGEM7gntKgdhIV, sowie der korrespondierende Wirtsstamm AT2471glfintPTS⁻ in je zwei Parallelansätzen kultiviert. Nach 48 h wurde aus den Ergebnissen die integrale biomassaspezifische Produktivität errechnet.

Im Vergleich zum Wirtsstamm E. coli AT2471glfintPTS⁻, dessen integrale biomassaspezifische Produktivität durch einen Indexwert von 100 repräsentiert ist, erreichte beschrieben ist, Erreichte die Mutante AT2471glfintPTS⁻/pGEM7gntKgdhIV eine integrale biomassaspezifische Produktivität mit einem Indexwert von 133.

Dieses Ergebnis zeigt, daß das Einbringen der Aktivität der Glukosedehydrogenase und Erhöhen der Aktivität der Glukonatkinase die Produktivität der Synthese von Phenylalanin gerade in jenen Mikroorganismen positiv beeinflußt, die sich durch ein in seiner Aktivität verminderter oder gänzlich ausgeschaltetes PTS-System auszeichnen und in denen gleichzeitig ein PEP-unabhängiges Zuckeraufnahmesystem integriert ist.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 198 18 541 A 1

Tabelle 1

	Stämme	Genotyp/Charakteristika	Quelle oder Referenz
5	<i>Bacillus megaterium</i> DSM 319	Donor für <i>gdhIV</i> -Gen	Nagao et al. J. Bacteriol. 174, 5013-5020
10	<i>E. coli</i> AT2471	<i>tyrA4</i> , <i>relA1</i> , <i>spot1</i> , <i>thi-1</i>	Taylor und Trotter, Bacteriol. Rev. 13 (1967) 332-53
15	JM109DE3	$\Delta(\text{pro-lac})/\text{F}'\text{pro}^+$ <i>lacZΔM15</i> ; trägt Gen für T7-RNA-Polymerase	Promega Co.
20	<i>E. coli</i> K-12 W3110	F-, prototropher Wildtypstamm <i>thi-1</i> ; Donor für <i>gntK</i> -Gen	Coli Genetic Stock Center, Yale Universität, New Haven, CT, U.S.A.
25	Plasmid pZY507	Cm ^r	Weisser et al., J. Bacteriol 177 (1995) 3351-4
30	pZY507 <i>glf</i>	<i>glf</i> -Gen aus <i>Z. mobilis</i> in pZY507	Weisser et al., J. Bacteriol 177 (1995) 3351-4
35	PGEM7	ApR; T7 und SP6 Promotoren	Promega Co.
40	PGEM7 <i>gntK</i>	pGEM7 mit <i>gntK</i> -Gen aus <i>E. coli</i>	diese Anmeldung
	PGEM7 <i>gdhIV</i>	pGEM7 mit <i>gdhIV</i> -Gen aus <i>Bacillus megaterium</i>	diese Anmeldung
	PGEM7 <i>gntKgdhIV</i> V	pGEM7 mit <i>gntK</i> und <i>gdhIV</i> -Genen	diese Anmeldung

Tabelle 2

Bestimmung der Glukosedehydrogenase- und Glukonatkinaseaktivität in Rohextrakten von *Escherichia coli* mit verschiedenen Genstrukturen

	Stamm	spezifische Aktivität Glukosedehydrogenase	spezifische Aktivität Glukonatkinase
55	W3110/pGEM7	n.n.	n.n.
	W3110/pGEM7 <i>gdhIV</i>	0.4 U/mg	n.b.
60	W3110/pGEM7 <i>gntK</i>	n.n.	0.9 U/mg
	W3110/pGEM7 <i>gntKgdhIV</i>	1.0 U/mg	0.9 U/mg

n.n. = nicht nachweisbare Aktivität; n.b. = nicht bestimmt

Patentansprüche

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Substanzen, bei dem in einem diese Substanzen produzierenden Mikroorganismus durch die Erhöhung der Aktivität eines Glukose oxidierenden Enzyms, glukosehaltige Substrate über einen alternativen Stoffwechselweg umgesetzt werden. 5
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Substanzen hergestellt werden, an deren Synthese das Intermediat Erythrose-4-Phosphat beteiligt ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität einer Glukosedehydrogenase in den Mikroorganismus eingebracht und/oder erhöht wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität einer Glukosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium* in den Mikroorganismus eingebracht und/oder erhöht wird. 10
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität der Glukosedehydrogenase IV aus *Bacillus megaterium* in den Mikroorganismus eingebracht und/oder erhöht wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich die Aktivität eines Glukonsäure phosphorylierenden Enzyms erhöht wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität einer Glukonatkinase erhöht wird. 15
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität einer Glukonatkinase aus *Escherichia coli* erhöht wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich die Aktivität einer Glukonolaktonase, insbesondere eine aus *Zymomonas mobilis*, erhöht wird. 20
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich die Aktivität eines Transportproteins zur PEP-unabhängigen Aufnahme eines Zuckers erhöht wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Transportprotein ein Facilitator ist.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Facilitator das Glukosefacilitator-Protein (Gf) aus *Zymomonas mobilis* ist. 25
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität eines Glukose oxidierenden Enzyms oder die Aktivität eines Glukose oxidierenden Enzyms und zusätzlich mindestens eines Aktivitäts aus Glukonsäure phosphorylierendem Enzym, Glukonolaktonase, Transportprotein zur PEP unabhängigen Zuckeraufnahme, gesteigert wird,
 - a) durch Einführung der Gene
 - b) und/oder durch Erhöhen der Genkopienzahl
 - c) und/oder durch Erhöhung der Genexpression
 - d) und/oder durch Erhöhung der endogenen Aktivität der genannten Enzyme
 - e) und/oder durch Strukturveränderung an den Enzymen
 - f) und/oder durch Verwendung von deregulierten Enzymen
 - g) und/oder durch Einführen von Genen, die für deregulierte Enzyme kodieren. 30
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Steigerung der Aktivität dadurch erreicht wird, daß eine Integration des Gens oder der Gene in eine Genstruktur oder in mehrere Genstrukturen erfolgt, wobei das Gen oder die Gene als einzelne Kopie oder in erhöhter Kopienzahl in die Genstruktur eingebracht wird. 35
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich die Aktivität eines PEP-abhängigen Zuckeraufnahmesystems, sofern anwesend, vermindert oder ausgeschaltet wird. 40
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß ein Mikroorganismus eingesetzt wird, in dem ein oder mehrere Enzyme, die zusätzlich an der Synthese der Substanzen beteiligt sind, dereguliert und/oder in ihrer Aktivität erhöht sind.
17. Verfahren nach der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die hergestellte Substanz eine aromatische Aminosäure ist. 45
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die aromatische Aminosäure L-Phenylalanin ist.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß der eingesetzte Mikroorganismus den Gattungen *Escherichia*, *Serratia*, *Bacillus*, *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* zugeordnet ist.
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Mikroorganismus *Escherichia coli* ist. 50
21. Genstruktur enthaltend in rekombinanter Form
entweder ein Gen kodierend für ein Glukose oxidierendes Enzym zusammen mit einem Gen kodierend für ein Glukonsäure phosphorylierendes Enzym,
oder ein Gen kodierend für ein Glukose oxidierendes Enzym zusammen mit einem Gen kodierend für ein Transportprotein zur PEP unabhängigen Aufnahme von Zuckern,
oder ein Gen kodierend für ein Glukose oxidierendes Enzym zusammen mit mindestens zwei der drei nachstehenden Genen, kodierend für ein Glukonsäure phosphorylierendes Enzym, für eine Glukonolaktonase oder für ein Transportprotein zur PEP unabhängigen Aufnahme von Zuckern. 55
22. Genstruktur nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen für das Glukose oxidierende Enzym eine Glukosedehydrogenase kodiert und das Gen für das Glukonsäure phosphorylierende Enzym eine Glukonatkinase kodiert.
23. Genstruktur nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen für die Glukosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium* stammt, das Gen für die Glukonatkinase aus *Escherichia coli* stammt und die Gene für die Glukonolaktonase und das Transportprotein aus *Zymomonas mobilis* stammen.
24. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form eine Genstruktur nach den Ansprüchen 21 bis 23. 60
25. Transformierte Zelle nach Anspruch 24 dadurch gekennzeichnet, daß in der Zelle ein oder mehrere Enzyme, die zusätzlich an der Synthese der Substanzen beteiligt sind, dereguliert und/oder in ihrer Aktivität erhöht sind.
26. Transformierte Zelle nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine *Escherichia coli*-

DE 198 18 541 A 1

Zelle ist.

27. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich das PEP-abhängige Zuckeraufnahmesystem, sofern anwesend, in seiner Aktivität vermindert oder ausgeschaltet ist.

28. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 24 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß sie in der Lage ist, eine

5 aromatische Aminosäure zu produzieren.

29. Transformierte Zelle nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die aromatische Aminosäure L-Phenylalanin ist.

30. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Substanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß transformierte Zellen nach einem der Ansprüche 24 bis 29, in denen eine Genstruktur nach einem der

10 Ansprüche 21 bis 23 vorliegt, eingesetzt werden.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65